

Acta Bot. Croat. 32 (1973) 43—47

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA FAGA
BAKTERIJE *BACILLUS THURINGIENSIS*

With Summary in English

ANA ŠARIĆ i MERCEDES WRISCHER

(Poljoprivredni fakultet Sveučilišta, Zagreb i Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb)

Primljeno 15. 2. 1973.

Uvod

Sporogene kristalotvorne bakterije iz skupine *Bacillus thuringiensis* patogene su za veći broj insekata iz skupine *Lepidoptera* pa se koriste kao insekticidi za suzbijanje tih štetnika. Aktivna tvar tih bakterijskih insekticida su spore i proteinski kristaloidi koji se formiraju u toku procesa sporulacije (sl. 2 i 3). Kristaloidi se oslobađaju zajedno sa sporom iz sporangija nakon završene sporulacije.

U industrijskoj proizvodnji bakterijskih insekticida vrlo često dolazi do kontaminacija s bakteriofagima koji liziraju bakteriju u fazi logaritamskog rasta, tj. prije formiranja spore i kristaloida, uslijed čega dolazi do gubitaka u proizvodnji.

Dosad je poznato više faga entomopatogenih bakterija (Chapman i Norris 1966, Colasito i Rogoff 1969a, 1969b, Norris 1961, Šarić 1969). Izolirani su većinom iz bakterijskih insekticida i iz tla. U ovom radu opisuju se svojstva bakteriofaga izoliranog iz bakterije *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Materijal i metode

Bakteriofag označen kraticom BTK—2 izoliran je iz lizirane tekuće kulture bakterije *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* serotip I, korištene za proizvodnju domaćeg bakterijskog insekticida Baktukal.

Kultura bakterije održavana je na kosom hranjivom agaru (Difco nutrient agar Na, 1,5%), pH. 7,2. Tekuća hranjiva podloga istog sastava (Difco nutrient broth, NB) bez agara, ali uz dodatak 0,001 M CaCl_2 upotrijebljena je u svim pokusima s bakteriofagima. Treća upotrijebljena

podloga bio je tekući hranjivi 0,7%-tni agar. Sve hranjive podloge imale su pH 7,0—7,2, a pokusi su izvedeni pri temperaturi od 34° C.

Bakteriofagi su se razmnažali u tekućoj i čvrstoj podlozi. Tekuća podloga inokulirana je kulturom bakterija s kosog agara. U ranoj logaritamskoj fazi rasta bakterije su inficirane fagima multipliciteta infekcije 0,1 (MOI 0,1). Nakon pojave lize, lizatu je dodan kloroform da se inaktiviraju neinficirane bakterije. Talog je uklonjen centrifugiranjem, supernatant je odvojen sa suspenzijom bakteriofaga; a određen je i titar bakteriofaga. S ploča s konfluentnom lizom fagi su ekstrahirani ili hranjivom tekućom podlogom ili puferiranom fiziološkom otopinom. Dobivene suspenzije faga visokog titra (10^{10}) čuvane su pri 4° C.

Postotak adsorpcije, latentni period i prosječan broj oslobođenih faga (burst size) određeni su prema Adamsu (1966).

Postotak adsorbiranih faga određen je prema broju slobodnih, neadsorbiranih faga. Koncentracija bakterijskih stanica iznosila je 10^8 /ml, a fagi su dodani u multiplicitetu infekcije (MOI) od 0,1. Adsorpcija je prekinuta nakon 5 minuta razrjeđivanjem 1:100 tekućom hranjivom podlogom koja je sadržavala kloroform.

Adsorpcijska smjesa je potom filtrirana kroz bakteriološki filter i u filtratu je određen broj slobodnih, neadsorbiranih faga metodom dvoslojnog agara.*

Latentni period i prosječan broj oslobođenih faga određen je postupkom »one step growth experiment«. U ovom pokusu je adsorpcija također prekinuta nakon 5 minuta razrjeđivanjem (1:100). Od ovog razrjeđenja napravljena su dalja razrjeđenja 1:10 000 (FGT) i 1:1 000 000 (SGT). Iz FGT i SGT uzimani su uzorci u određenim vremenskim razmacima, počev od 10. minute pa do 70. minute, i zasijani metodom dvoslojnog agara.

Osjetljivost drugih sojeva *B. thuringiensis* prema izoliranom bakteriofagu ispitana je također metodom dvoslojnog agara.

Ispitani su slijedeći sojevi: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (053), *B. thuringiensis* var. *galleriae* (63—5), *B. thuringiensis* var. *alesti* (Fr.) i *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* (SSSR).

Stabilnost bakteriofaga BTK-2 ispitana je u odnosu na različiti pH i na različite uvjete održavanja. Utjecaj pH ispitivan je u tekućoj hranjivoj podlozi kojoj je pH podešavan s 1 M NaOH i 1 M HCl u granicama od pH 4,0 do pH 9,0.

Preparati bakteriofaga za elektronsko-mikroskopska istraživanja priređeni su metodom negativnog kontrastiranja fosforno-volframskom kiselinom.

Bakterijski preparati fiksirani su glutaraldehidom i osmijevim tetroksidom, uklopljeni su u araldit i rezani ultramikrotomom; ultratanki pre-rezi kontrastirani su uranil acetatom i olovnim citratom. Preparati faga i bakterija snimljeni su Siemensovom Elmiskopom I Instituta za biologiju Sveučilišta u Zagrebu.

* Uzorci od 0,1 ml presađeni su u 2,5 ml toplog tekućeg agara u koji je zasađena suspenzija mladih bakterijskih stanica. Nakon što se dobro izmiješa, prelije se na čvrsti hranjivi agar u Petrijevoj posudi.

Rezultati

Izolirani bakteriofag BTK-2 po svojim morfološkim karakteristikama pripada grupi A faga prema klasifikaciji Bradleya (1967). Ima glavu heksagonalnog profila (sl. 1) promjera 73 nm, vrlo kratak vrat i rep s kontraktilnim tokom. Dužina kontrahiranog toka iznosi 60 nm, širina 19 nm a ukupna dužina faga iznosi 219 nm. Pri bazi toka nalaze se fibrili kojima se fagi često međusobno povezuju u obliku rozete (sl. 1).

Određivanjem broja slobodnih faga u lizatu ustanovili smo da se nakon 5 minuta na bakterije adsorbira samo oko 50% dodanih bakteriofaga.

»One step growth« eksperimentom utvrdili smo da latentni period faga BTK-2 iznosi oko 35 minuta. Zasićivanjem lizata u određenim vremenskim razmacima nakon adsorpcije ustanovili smo da je broj plakova u 35. minuti nakon adsorpcije naglo porastao što je značilo da je latentni period završen i da je već došlo do lize inficiranih bakterija. Broj plakova nakon lize podijeljen s brojem plakova (infektivnih centara) u latentnom periodu dao je prosječan broj čestica faga oslobođenih po jednoj bakteriji, a iznosio je 120.

Stabilnost BTK-2 u medijima s različitim pH mjerena je brojem preživjelih faga. Najveću stabilnost pokazuje BTK-2 pri pH 7,0—7,5, a inaktivira se pri pH 5 i pH 9.

Titir faga BTK-2 koji je držan pri temperaturi od 4° C nije se bitno izmijenio ni nakon 6 mjeseci, a isto tako ni pri sobnoj temperaturi nakon tri mjeseca. Na kosom agaru uz podložni sloj bakterije ostao je aktivan i nakon godinu dana.

BTK-2 na podložnom soju bakterije *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* proizvodi male bistre plakove cjelovita ruba i promjera oko 2 mm. Lizira i sve druge ispitane sojeve osim *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*.

Diskusija

Izolirani bakteriofag BTK-2 morfološki je veoma sličan virulentnom fagu GV-6 koji su izolirali Colasito i Rogoff (1969a, 1969b), ali postoje razlika u drugim svojstvima. BTK-2 nije osjetljiv na kloroform; njegov latentni period iznosi 35 minuta, dok GV-6 ima latentni period od 85 minuta. Prosječan »burst size« je manji: kod BTK-2 iznosi 120 faga na jednu bakteriju, a kod GV-6 200. Adsorpcija je kod oba faga podjednaka, tj. nakon 5 minuta adsorbira se oko 50% faga.

BTK-2 je također morfološki sličan fagu III, ali je od njega znatno manji. Fag III izolirali su Chapman i Norris (1966), no na žalost osim morfoloških karakteristika o fagu III ne postoje drugi podaci potrebni za njegovu karakterizaciju.

Moglo bi se stoga pretpostaviti da BTK-2 predstavlja jedan još neopisani fag entomopatogene bakterije *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Zaključak

Iz bakterije *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, serotip I, izoliran je virulentni bakteriofag BTK-2. Po morfološkim karakteristikama pripada grupi A klasifikacije po Bradleyu. Ima glavu heksagonalnog profila promjera 73 nm, kratak vrat i kontrahirani rep. Dužina kontrahirana toka iznosi 60 nm, širina 19 nm; ukupna dužina faga je 219 nm. Na podložnom soju bakterije iz koje je izoliran proizvodi male bistre plakove cjelovita ruba i promjera oko 2 mm.

Nakon 5 minuta adsorpcije adsorbira se 50% virusnih čestica. Adsorpcija je određena prema broju slobodnih neadsorbiranih faga. Latentni period, određen »one step growth« eksperimentom, iznosi 35 minuta. Iz jedne inficirane bakterije oslobađa se prosječno 120 virusnih čestica.

BTK-2 je dosta stabilan bakteriofag. Čuvan pri temperaturi od 4° C infektivan je i nakon 6 mjeseci, a pri sobnoj temperaturi očuva infektivnost 3 mjeseca. Najstabilniji je pri pH 7,0—7,5, a inaktivira se pri pH 5,0 i pH 9,0.

Prema navedenim karakteristikama pretpostavlja se da je BTK-2 nov još neopisan fag bakterije *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Literatura

- Adams, M. H., 1966: Bacteriophages, New York Interscience Publishers Inc.
- Bradley, D. E., 1967: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bact. Rev. 31, 230.
- Chapman, H. M., and J. R. Norris, 1966: Four new bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. J. appl. Bact. 29, 529.
- Colasito, D. J., and M. H. Rogoff, 1969a: Characterization of lytic bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. J. gen. Virol. 5, 267.
- Colasito, D. J., and M. H. Rogoff, 1969b: Characterization of temperate bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. J. gen. Virol. 5, 275.
- Norris, J. R. 1961: Bacteriophages of *Bacillus cereus* and of crystal forming insect pathogens related to *Bacillus cereus*. J. gen. Microbiol. 26, 167.
- Šarić, A., 1969: Izolacija i morfologija bakteriofaga specifičnog za *Bacillus thuringiensis*. I kongres mikrobiologa Jugoslavije, 745.

Sl. 1. Bakteriofagi BTK-2 s punim i praznim glavicama. Negativno kontrastiranje. 200 000 : 1.

Fig. 1. Bacteriophages BTK-2; Intact particles and particles with empty heads. Negative staining. 200,000 : 1.

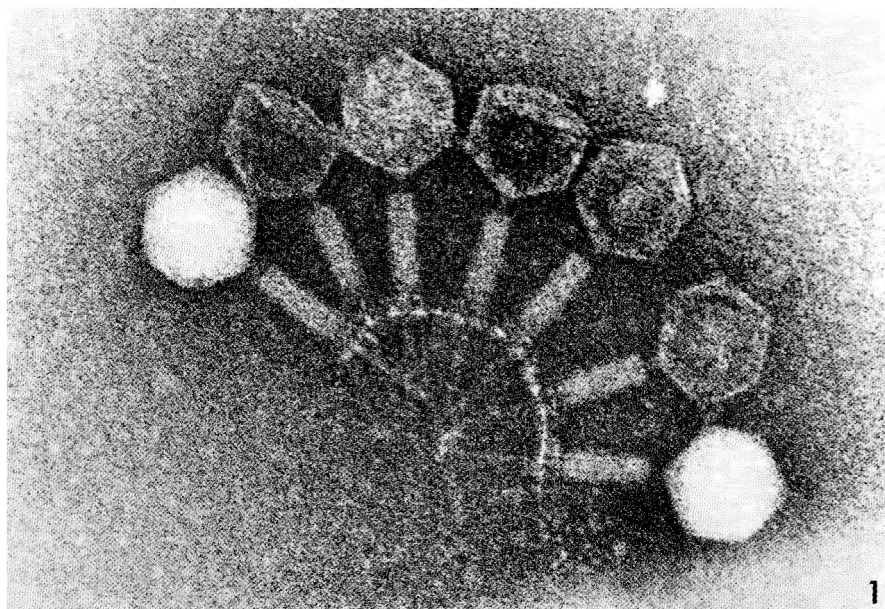
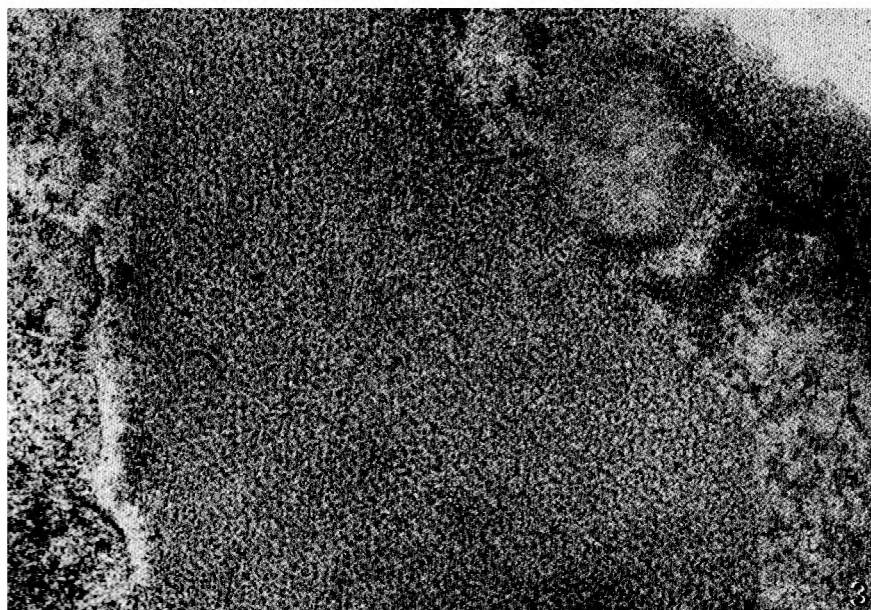


Fig. 1. — Sl. 1.



Sl. 2--3. — Fig. 2—3.

SUMMARY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PHAGE OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Ana Šarić and Mercedes Wrischer

(Faculty of Agriculture, University of Zagreb and Ruder Bošković Institute, Zagreb)

A phage isolated from insect pathogen and crystal forming bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, serotype I, was characterized. The isolated phage, called BTK-2, belongs to Bradleys group A according to its morphological characteristics. It has a head with a hexagonal outline of 73 nm in diam. and a very short neck. The tail has a contractile sheath, 60 nm long and 19 nm wide. At the distal end of the sheath a terminal structure is visible. The total length of the phage is 219 nm. It produces small clear plaques up to 2 mm in diam; BTK-2 is not sensitive to chloroform.

The kinetics of growth was studied in the »one step growth experiment« (A d a m s 1966). BTK-2 has a latent period of 35 minutes and the average burst size of 120 virus particles per infected cell. The adsorption rate was estimated from the number of free unadsorbed phage particles according to A d a m s (1966). Only 50% of phages were adsorbed after an adsorption period of 5 minutes.

The phage was grown in nutrient broth with 0.001 M CaCl_2 . In all experiments the MOI was 0.1 or 1.0.

BTK-2 is a rather stable phage; it did not loose its infectivity after a six month storage at 4°C or after a three month storage at room temperature. Its stability was maximal at pH 7.0—7.5.

The isolated virulent phage BTK-2 seems to differ from previously reported virulent phage GV-6 (Colasito and Rogoff 1969a).

Prof. dr Ana Šarić
Zavod za fitopatologiju
Poljoprivredni fakultet
Šimunska 25
41000 Zagreb (Jugoslavija)

Dr Mercedes Wrischer
Institut »Ruder Bošković«
Bijenička 54
41000 Zagreb (Jugoslavija)

Sl. 2. Bakterija sa sporom (s) i kristaloidom (k). Ultratanki prerez. 44 000 : 1.

Fig. 2. Bacterial cell with spore (s) and crystal (k). Ultrathin section. 44,000 : 1.

Sl. 3. Dio kristaloida iz bakterije. Ultratanki prerez. 180 000 : 1.

Fig. 3. Part of bacterial crystal. Ultrathin section. 180,000 : 1.